

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029251 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/53, 都府 京都市 南区東九条西明田町 5 7 番地 アーク
9/06, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/26 レイ株式会社内 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011766 (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒
540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP
ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 16 日 (16.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-277214 2002 年 9 月 24 日 (24.09.2002) JP
特願 2002-309734
2002 年 10 月 24 日 (24.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アーク
レイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京
都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 信行
(YOSHIDA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒631-0034 奈良県 奈
良市 学園南 3 丁目 15-35 学園南ハイツ 102 号 Nara (JP).
谷 吉樹 (TANI, Yoshiki) [JP/JP]; 〒603-8064 京都府 京
都市 北区上賀茂蒲田町 56, 60 番地-1 Kyoto (JP).
米原 聡 (YONEHARA, Satoshi) [JP/JP]; 〒601-8045 京
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/029251 A1

(54) Title: FRUCTOSYLAMINE OXIDASE

(54) 発明の名称: フルクトシルアミンオキシダーゼ

(57) Abstract: A fructosylamine oxidase being an enzyme obtained by culturing *Fusarium proliferatum*, separating two types of fructosylamine oxidases (FAO) with different substrate specificities from the culturing product and purifying them, which fructosylamine oxidase is useful in the measurement of Amadori compounds.

(57) 要約: 本発明は、フサリウム・プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) を培養し、培養生成物から得られる基質特異性の異なる 2 種類のフルクトシルアミンオキシダーゼ (FAO) を精製することにより得ることができる酵素であって、アマドリ化合物の測定に有用なフルクトシルアミンオキシダーゼを提供する。

明 細 書

フルクトシルアミノキシダーゼ

5

技術分野

本発明は、新規なフルクトシルアミノキシダーゼに関し、さらに詳しくは、フサリウム プロリフェラタム由来のフルクトシルアミノキシダーゼ、その製造方法、及びそれを用いるアマドリ化合物の測定方法に関する。

10

背景技術

アマドリ化合物は、血液や食品中のタンパク質、ペプチド及びアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、例えばグルコースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ不可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができることから、アマドリ化合物の分析は、医療分野、食品分野等で有用である。特に医療分野で注目されているのは、糖尿病の診断及び管理の指標としての糖化タンパクである。糖尿病は、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害を初め様々な全身症状（合併症）を引き起こす疾患であり、失明や透析導入の最も主要な原因となっている。これらの合併症は、患者の生活や社会活動を制限するばかりか医療費の増加にもかかわっており、深刻な社会問題である。従って、糖尿病の早期発見と発見後の適切な血糖コントロールの重要性が指摘されている。糖尿病における血糖コントロールの指標として、通常、過去約1～2ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン、過去約2週間の平均血糖値を反映する糖化アルブミン、あるいは血清中の還元能を示す糖化タンパク質を意味するフルクトサミン等が測定される。糖化ヘモグロビン（HbA1c）はヘモグロビンのβ鎖N末端バリンのα-アミノ基が糖化されたものであり、HbA1cの測定は糖尿病患者の血糖コントロールにおいて重要な役割を占めている。

25

アマドリ化合物の酵素法による分析は、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、生成する過酸化水素量又は消費される酸素量に基づいて、その量を測定することで行われる。該酸化還元酵素の一つであるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、通常、微生物から精製されている[例えば特許文献1～6(特公平6-65300号公報、特開平3-155780号公報、特開平7-289253号公報([0031]、[0037])、特開平8-154672号公報(請求項2、[0027])、特開平11-243950号公報([0037])、特開平5-192193号公報)参照]。

これらの文献に記載の酵素について簡単に説明すると、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)由来の酵素には α -アミノ基糖化アミノ酸に特異的であり、フルクトシルリジン(以下、「FL」と称することもある)には作用しないものがあるが、これは熱安定性が悪く(45℃、10分の熱処理で90%以上失活)実用性に乏しい(特公平6-65300号公報)。アスペルギルス属(*Aspergillus*)由来の酵素には、FLに対する活性が、フルクトシルバリン(以下、「FV」と称することもある)に対する活性より低いものがあるが、その糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については不明である(特開平3-155780号公報参照)。ギベレラ属(*Gibberella*)由来の酵素には α アミノ基が保護された、フルクトシルN α -Z-リジン(以下、FZLと称することもある)に対して高い特異性を有し、フルクトシルポリリジンに対して活性があるが、フルクトシルバリンには作用しないものがある(特開平7-289253号公報([0031]、[0037])参照)。また、フサリウム属(*Fusarium*)が産生する酵素にはフルクトシルリジンに対する活性がフルクトシルバリンに対する活性と同等かより高いものがある(特開平8-154672号公報(請求項2、[0027])参照)。また、他のフサリウム属(*Fusarium*)やギベレラ属(*Gibberella*)から産生される酵素にはフルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的なものもある(特開平11-243950号公報([0037]))。

しかしながら、既存の酵素は、例えば糖化ヘモグロビンの測定における活性等に関して十分に満足できないことから、活性が高く、特異性に優れた酵素が望まれていた。すなわち、これら既存の酵素の場合、プロテアーゼ処理等により断片化処理された糖化アミノ酸や糖化ポリリジンに対する活性は認められるが、 α 位

が糖化された糖化ペプチドに対する活性は殆ど認められない。従って、例えば、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基をN-末端に有する糖化ヘモグロビンの場合は、N-末端のフルクトシルバリンを確実に遊離させる必要がある。

5 一般に、従来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて糖化タンパクを正確に測定するには、該酵素の基質となる糖化アミノ酸を確実に遊離させることが前提となるが、実際には、目的の糖化アミノ酸を確実に遊離させる方法はなく、それを可能にするほど特異性の高いプロテアーゼも提供されていない。この問題を解決する一つの方法は、N末端が糖化されたペプチドそのものに反応し得るフルクトシルアミノオキシダーゼを使用することである。とりわけ糖尿病のコントロールに重要なヘモグロビンA1c (HbA1c) を正確かつ効率良く測定するには断片化産物としての糖化ペプチドにも活性なフルクトシルアミノオキシダーゼを使用する必要がある。

発明の開示

従って、本発明はアマドリ化合物、特に糖化タンパクを正確かつ効率良く測定
15 するために、新規で有用なフルクトシルアミノオキシダーゼ（以下、「FAO」と呼称することもある）を提供することを目的するものである。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、フサリウム (*Fusarium*) 属の菌株が基質特異性において優れたFAOを生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

20 即ち、本発明は、フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) 由来のフルクトシルアミノオキシダーゼを提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) の培養物の、Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク (OD=280 nm) と活性の溶出パターンを示す図である。
25

図2は、本発明の酵素の一つであるFAO-Q1の溶媒中での活性とpHとの関係を示すグラフである。

図3は、本発明の酵素の一つであるFAO-Q2の溶媒中での活性とpHとの関係を示すグラフである。

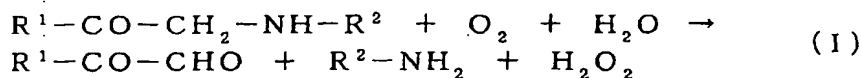
図4は、FAO-Q1の溶媒中での活性と温度との関係を示すグラフである。

図5は、FAO-Q2の溶媒中での活性と温度との関係を示すグラフである。

図6は、FAO-Q1及びFAO-Q2のゲル濾過法による分子量の測定結果を示す図である。

5 発明を実施するための最良の形態

本発明のフルクトシルアミンオキシダーゼは、以下の式(1)で示される反応における触媒活性を有する。



(式中、 R^1 は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$ (n は5又は6である)、 R^2 はアミノ酸残基又はアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す。)

10 上記の式(1)において、 R^2 はアミノ酸残基又はアミノ酸2～10個のペプチド残基であり、好ましくは、アミノ酸残基又はアミノ酸2～6個のペプチド残基、より好ましくはアミノ酸残基又はアミノ酸2～3個のペプチド残基である。

R^2 を構成するアミノ酸は測定すべきアマドリ化合物により異なるが、例えば、バリン、リジン、ヒスチジン、ロイシン、セリンを挙げることができる。 R^2 が
15 ペプチド残基である場合は、バリン又はロイシンをN-末端に含む2～10個のアミノ酸からなるペプチド残基である。バリンをN末端に有するアミノ酸数2～3個のペプチド残基がより好ましく、そのようなペプチドの具体例として、バリン-ヒスチジン、バリン-ヒスチジン-ロイシンが挙げられる。

本発明のFAOがHbA1cの測定に用いられるものである場合、上記のごとく、 α -アミノ基が糖化されたバリン、即ちフルクトシルバリン(FV)、又は
20 FVをN末端に有するペプチドに対して活性があることが好ましい。一方、糖化アルブミンの測定に用いられるものである場合、糖化アルブミン分子ではリジンの ϵ -アミノ基が糖化されていることから、 ϵ -アミノ基が糖化されたフルクトシルリジン(ϵ FL)又は ϵ FLを含むペプチドに対して活性があることが好ま
25 しい。

本発明のFAOは、酵素作用を有する限りその起源は特に制限されない。例えば、特定の糖化アミノ酸又は糖化ペプチドのみを炭素源及び窒素源として含有

する培地で生育する微生物により産生され、糖化アミノ酸及び糖化ペプチドを基質として酵素活性を発揮するFAOは本発明に有用である。上記の微生物のスクリーニングに用いる糖化ペプチドとしては、目的の糖化タンパクを断片化した場合に生成されるものが例示される。そのような糖化ペプチドのみを炭素源及び窒素源とする培地で培養した菌体より酵素を精製し、その活性を確認することにより、目的のFAOを得ることができる。後述するように、本発明者らはフルクトシルバリニン-ヒスチジン-ロイシン (FVHL) を用いて土壤中の微生物をスクリーニングし、FVHL資化能を有する、フサリウム属 (*Fusarium*) の微生物を見出した。

なお、上記のFVHLは、ヘモグロビン β 鎖のN末端と同じ配列を有していることから、該ペプチドはHbA1cの測定に有用なFAOをスクリーニングするのに好適である。そのような糖化ペプチドは当該技術分野で既知の方法で製造することができる。

従って、本発明のFAOはフサリウム属の菌株を用いて微生物学的に製造することができる。好ましい微生物はフサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) 又はその変異体である。

フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) は、実施例1に記載の方法により、本発明者らが土壤中から新たに分離した菌株であり、本菌株は茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている (微生物の表示: *Fusarium* sp. GL2-1株、受領日: 受託日: 平成14年9月9日; 受託番号FERM P-19005) (国際寄託への移管日: 平成15年8月11日; 受託番号: FERM B P-8451)。本発明のフサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) を、以下、「GL2-1株」とも表記する。

GL2-1株を元株として、変異体誘導や組換え遺伝子技術などにより、FVHLや他の基質に対する活性が高められた派生菌株を得ることができる。そのような変異株も本発明のFAOの供給源である。そのような派生菌株は、人為的に突然変異を誘発されたものや、スクリーニングで得られたもの等を包含する。

本発明のFAOは、グルコース-バリン褐変培地 (以下、GV褐変培地と

称する)でFAO産生能を有する微生物を培養すると、生産される。GV褐変化培地は、グルコースとバリンを温度120℃において30分間、オートクレープ処理することにより得られる。好ましいGV褐変化培地の例として、グルコース1.5%、L-バリン0.5%、 K_2HPO_4 0.1%、 NaH_2PO_4 0.1%、
5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%、酵母エキス0.2%を含有する培地を挙げることができる。

培養は、通常、25~37℃、好ましくは28℃で行われる。培地のpHは4.0~8.0の範囲であり、好ましくは5.5~6.0である。しかしながら、これらの条件は、それぞれの菌の状態に応じて適宜調整されものであり、上記に限定され
10 れない。

例えば、GL2-1株をこのような条件下、12~36時間、好ましくは24時間培養すると、FAOが菌糸体内に蓄積される。したがって、ろ過により回収した菌糸体を定法に従って遠心分離すれば無細胞抽出液を得ることができる。細胞の磨砕は、機械的手段又は溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧
15 などのいずれでもよい。

酵素の分離精製法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィなどを、適宜組み合わせて行う。

例えば、培養物を、遠心又は吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、1mM DTTを含む0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、ミニビードビータ(ガラスビーズ0.5mm)で菌糸体を破碎し、遠心分離して得た上清(無細胞抽出液)を硫酸分画し、透析した後、Resource Q カラムクロマトグラフィー(アマシャム バイオシステムズ社製)で処理することにより精製する。
20

あるいは、FAOが培地中に分泌又は蓄積される場合は、それ自体既知の方法に従い、例えば、イオン交換樹脂処理法、活性炭吸着処理法、有機溶媒沈殿法、減圧濃縮法、凍結乾燥法、結晶化法等を適宜組み合わせて分離精製することができる。
25

以上に述べた方法で、GL2-1株の培養物から、Resource Q カラムクロマトグラフィーで異なる保持時間を示す、少なくとも2種類の、GL2-1株由来

のFAOを得た。1つはフルクトシルバリン (FV) 及びN- α フルクトシルリジン (FZL) の両方に活性な酵素 (以下、「FAO-Q1」と称する) であり、他方はFVには活性があるが、FZLには活性を示さない酵素 (以下、「FAO-Q2」と称する) である。なお、本明細書では、GL2-1株が産生するFAO-Q1, FAO-Q2についてその製造や同定に関して記載しているが、本発明は特定の起源に限定されず、本発明の目的に適う、下記の特性を有する全FAOを包含する。

本発明のGL2-1株由来の酵素について以下に詳細に説明する。

FAO-Q1

- ① フルクトシルバリンに対する活性が、フルクトシルリジンに対する活性とほぼ同等か若しくはそれよりも高い。
- ② 酵素反応における至適pHが7.5である。
- ③ 酵素の安定性に好適な温度が約30～40℃である。
- ④ SDS-PAGEによる分子量が約39kDaであって、ゲル濾過法による分子量が約39.4kDaである。

FAO-Q2

- ① フルクトシルリジンに対して検出可能な活性がなく、フルクトシルバリンに対する活性がある。
- ② 酵素反応における至適pHが7である。
- ③ 酵素の安定性に好適な温度が約30～40℃である。
- ④ SDS-PAGEによる分子量が約49kDaであって、ゲル濾過法による分子量が約58kDaである。

これら2つの酵素の一般的な特性は以下の通りである。

1. 一般的な誘導特性

- いずれもFVHLによって誘導される酵素であり、FVHLを唯一の炭素源及び窒素源とする培地で誘導される。

2. 反応特異性及び基質特異性

GL2-1株の培養物から部分精製した酵素は、実施例2(1)に記載されているように、Resource Q カラムクロマトグラフィーにおいて、異なる保持時間

を示す活性な画分Q1、Q2を含んでおり、各画分は、それぞれ、本明細書中で「FAO-Q1」及び「FAO-Q2」と呼称する酵素を含有していた。上で述べたように、FAO-Q1はFV及びFZLの両方に同程度の活性を有し、かつFVLにも活性であり、他方、FAO-Q2はFVには活性であり、FVH、FVHLというN-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示したが、FZLには活性を示さなかった。

3. pH及び温度の条件

至適pHの検討

前記活性測定法方法に準じ、pH3.5から10.0の範囲の各pH条件により酵素反応を行った。

ただし、使用したバッファーはpH3.5から6.0の範囲では100mM酢酸バッファー、pH6.0から8.0の範囲では100mMリン酸カリウムバッファー、pH7.0から9.0の範囲では100mMトリス-塩酸バッファー、pH9.0から10.0の範囲では100mMグリシン-NaOHバッファーであった。

図2及び図3に示す通り、本発明の酵素FAO-Q1の至適pHは、30℃において約7.5であることが、FAO-Q2の至適pHは、30℃において約7.0であることが判明した。

酵素の安定性に好適な温度の検討

酵素の温度条件は、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)中で30～65℃の温度条件にFAO-Q1又はFAO-Q2を加え、10分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定し、判定した。測定結果を図4及び図5に示す。これらの図より、酵素の安定性に好適な温度範囲は30℃から40℃であることが判明した。

4. 力価の測定

酵素の力価測定は、例えば、実施例1(3)に記載されている、当該技術分野で既知の方法(速度法)で行うことができる。この方法では、FAOと糖化アミノ酸又は糖化ペプチドとの反応によって生成する過酸化水素を、該過酸化水素の存在下で生成するキノン色素による吸光度(505nm)に基づいて測定する。キノン色素の分子吸光係数 $5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から、1分間に生成する

過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位（ユニット：U）とする。

なお、活性の測定は上記の方法に限定されず、その他の方法（終末法、又は酸素吸収量を測定する方法等）を用いても同様に本発明のFAOの酵素活性を測定することができる。

ミハエリス定数の測定

上記の力価測定法において、酵素濃度、pH、温度などの条件を一定に保ち、基質の濃度だけを変化させながら反応の初速度を測定し、各基質に対するミハエリス定数を求めることができる。

10. 本発明のFAOのうち、FAO-Q1はFV及びFZLにほぼ同程度の活性を示すことから、広くアマドリ化合物の分析に有用である。一方、FAO-Q2はFVには活性であるがFZLには活性を示さないことから、糖化ヘモグロビンを選択的に分析するのに有用である。しかも、FAO-Q2は、糖化ヘモグロビンのN-末端配列であるFVH、FVHLにも活性を示すことから、該酵素を用い
- 15 れば、糖化ヘモグロビン内部の糖化（ε位）を測定することなく、N末端の糖化のみを測定することができるため、より正確にHbA1cの測定が行える。

- 本発明のFAOを用いて糖化タンパク等のアマドリ化合物を分析するには、既知の方法に従い、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFAOとを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定すればよい。任意の試料を用い
- 20 ることができ、例えば、血液（全血、血漿又は血清）、尿等に代表される生体由来の試料の他、醤油等の食品が挙げられる。特に好ましいのは血液である。

本発明のFAOの使用に際して、反応溶液のpH及び温度は、それぞれ、使用する酵素に適した条件とする。即ち、FAO-Q1の場合、pH約6.5～12、好ましくは約7～8、より好ましくは約7.5、温度約30～40℃で行う。

- 25 また、FAO-Q2の場合、pH約6～10、好ましくは約6.5～8、より好ましくは約7、温度約30～40℃で行う。但し、基質や他の反応条件により適宜変更が可能であり、上記に限定されない。

FAOの使用量は、それぞれ、使用する測定法に応じて適宜選択することができるが、通常、0.1ユニット/ml以上、好ましくは1～100ユニット/mlで

ある。緩衝液としてはTris-HCl等を用いる。

本発明のFAOで糖化タンパクを分析するには、あらかじめ断片化处理し、糖が結合したアミノ酸残基又はペプチドを遊離させてから行うことが好ましい。そのような方法は化学的な方法、酵素を用いる方法を含めて、当該技術分野で既知である。しかしながら、本発明のFAO、特にFAO-Q2の場合は、糖化アミノ酸のみならず糖化タンパクの分解産物としての糖化ペプチドにも活性があるため、上記の断片化处理が完璧でなくても良好な精度で測定することができる。

従って、本発明はまた、上記のFAO (FAO-Q1又はFAO-Q2)を用いて、試料中に含まれるアマドリ化合物を測定する方法を提供するものである。

本発明の測定方法に用いるFAOは、該FAOを産生するフサリウム プロリフェラタムFERMBP-8451を栄養培地で培養し、培養物から、産生された本発明のFAOを分離精製することにより製造することができる。このようにして得られる、いわゆる天然のFAOは、本発明の目的に適う限り、自然に起こりうる修飾や変異を有していてもよく、また測定の精度、信頼性に影響しないことを条件として、培養物からの分離、精製工程で混入しうる酵素以外の物質を伴っていてもよい。

また、本発明のFAOは遺伝子組換え技術によっても製造することができる。即ち、配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを用い、常法により、それぞれ、FAO-Q1及びFAO-Q2に対応する組換えタンパク質を得ることができる。

従って、本発明は、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列を有するFAOを提供するものである。

なお本明細書中、「FAO (FAO-Q1、FAO-Q2を含む)」というときは、特記しない限り天然の微生物起源から分離した酵素と、組換え型酵素の両方を包含するものとする。

また、本発明は、本発明のFAOをコードするDNAを提供するものである。

本発明のDNAは、好ましくは、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列で表されるタンパク質をコードしており、より好ましくは、配列番号3又は配列番号5に記載のヌクレオチド配列を有する。

遺伝子組換え技術による組換えタンパク質の製造方法は当該技術分野で既知であり、例えば、本発明のDNAを適当な宿主に導入し、得られた形質転換体を培養し、ついて培養物から本発明のFAOを分離・精製することにより、所望の活性を有する組換えタンパク質を得ることができる。なお、このような方法で得られる本
5 発明の組換え型FAOは、配列番号4及び配列番号6に記載のアミノ酸配列に限定されず、上記の定義に従う限り、該配列から常法に従って導かれるアミノ酸配列を有するタンパク質、並びに配列番号4及び配列番号6に示したアミノ酸配列の、所望の酵素活性を有するそのフラグメントをも包含することは当業者ならば容易に理解しうることである。

10 組換え型FAOの製造は既知の方法で行うことができ、例えば、FAOをコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入して様々な宿主内でFAOを発現する発現ベクターを構築する。次いで、この発現ベクターを用いて適当な宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては、微生物〔原核生物（細菌、例えば大腸菌や枯草菌等）、真核生物（例えば酵母）〕、動物細胞又は培養
15 植物細胞が挙げられる。それぞれの宿主に関して適当な宿主ベクター系が知られており、文献(例えばMolecular Cloning : A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 記載の方法や既知の方法で発現させることができる。

発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も文献(例えば、Molecular Cloning、
20 前掲) 記載か当業者既知の方法で行うことができる。

得られた形質転換体の培養も、それぞれの宿主に適した培地を選択するか、新たに調製したして実施することができる。通常、培地には炭素源（例えばグルコース、メタノール、ガラクトース、フルクトース等）及び無機また有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カ
25 ザミノ酸等）を含有してよい。所望により、培地に他の栄養源（例えば無機塩類（塩化ナトリウム、塩化カリウム）、ビタミン類（例えばビタミンB1）、抗生物質（例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン等））を加えてもよい。哺乳動物細胞の培養には、イーグル培地が適当である。

形質転換体の培養は、通常、pH 6.0～8.0、好ましくはpH 7.0、25～4

0℃（好ましくは30～37℃）で8～48時間行えばよい。生産されたFAOが培養溶液、培養濾液(上澄み)中に存在しているときは、培養物を濾過又は遠心分離する。培養濾液から、FAOを天然又は合成のタンパク質の精製、単離に一般的に用いられる常法（例えば透析、ゲル濾過、抗FAOモノクローナル抗体を用いてのアフィニティカラムクロマトグラフィー、適当な吸着剤を用いてのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等）によって精製できる。生産されたFAOが培養形質転換体のペリプラズム及び細胞質中に存在するときは、濾過や遠心分離によって細胞を集め、それらの細胞壁及び／又は細胞膜を、たとえば超音波及び／又はリゾチーム処理によって、破壊して、デブリス（細胞破砕物）を得る。デブリスを適当な水溶液（例えばトリスー塩酸緩衝液）に溶解させる。この溶液から、上記の方法に準じてFAOを精製することができる。酵素活性を有するフラグメントが必要であれば、例えば制限酵素処理やエキソヌクレアーゼ処理等により断片を得る。このように、組換技術を利用することにより、任意の宿主細胞を用いてFAOを効率よく製造することが可能となる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1 FAOを生産する微生物のスクリーニングと同定

(1) FAOを生産する微生物のスクリーニング

糖化ヘモグロビンのβ鎖N末端配列を持つフルクトシルバリナーヒスチジノーロイシン（FVHL）を、VHLのグリコシル化により調製した。そのような方法は当業者に既知である。

このFVHLを単一の炭素源及び窒素源とする培地（FVHL培地）を用いて、土壌よりFVHL資化性菌を分離した。試験管（16.5mm径）にFVHL培地5mlを入れ、採取した土壌を添加して30℃で48時間、振盪（300rpm）培養した。

(FVHL 培地)

FVHL	5	g
K ₂ HPO ₄	1	g
NaH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5	g

	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
	ビタミン混合物*	0.1% (v/v)
	金属溶液**	1.0% (v/v)
	蒸留水	適量
5	全量	1,000 ml
	(*ビタミン混合物)	
	チアミンHCl	1 mg
	リボフラビン	2
	パントテン酸カルシウム	2
10	ピリドキシンHCl	2
	ビオチン	0.1
	p-アミノ安息香酸	1
	ニコチン酸	2
	葉酸	0.1
15	蒸留水	適量
	全量	100 ml
	(**金属溶液)	
	$\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.7 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2
20	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.4
	$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.28
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.26
	H_3BO_3	0.4
	KI	0.06
25	蒸留水	適量
	全量	1,000 ml

その結果、FVHLを資化する13株を得た。それらを下記の培養、活性確認に供し、FAO活性を有する物質を産生する菌株をさらに選抜した。

(2) 培養及び無細胞抽出液の調製

上記(1)で得た13株をグルコース-バリン(GV)褐変化培地で培養し、粗酵素液を調製した。

(GV褐変化培地)

	グルコース	1.5	% (w/v)
5	L-バリン	0.5	
	K_2HPO_4	0.1	
	NaH_2PO_4	0.1	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01	
10	酵母エキス	0.2	

試験管(16.5mm径)にGV褐変化培地5mlを入れ、30℃で24時間、振盪培養(300rpm)した。次いで、フィルターでろ過して菌糸体を回収し、ミニビードビータ(ガラスビーズ0.5mm)で菌糸体を破碎し、遠心分離(4℃、10,000×g、10min)して無細胞抽出液を調製し、粗酵素液として使用した。

(3) FAO活性の測定

粗酵素液のFAO活性を前記の速度法で測定した。即ち、以下の混合物中で生成する過酸化水素を比色法で経時的に測定し、FAO活性を確認した。

	Tris-HCl緩衝液(pH8.0)	100	μmol
20	4-アミノアンチピリン	4.5	μmol
	フェノール	6	μmol
	FV	5	μmol
	パーオキシダーゼ	6	units
	粗酵素液(無細胞抽出液)	1	ml
25	全量	3	ml

酵素液以外の混合物(全量3ml)を30℃で平衡化した後、酵素液を添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数($5.16 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位(ユニット:U)とした。その結果、

FAOを有する1つの株を得た。

(4) 株の同定

菌学的性質

5 ポテトデキストロース寒天 (PDA)、オートミール寒天 (OA)、及び2%
麦芽寒天培地 (MEA) の各プレートに播種後、25℃で最長8週間培養し、菌
学的特性を観察した。コロニーの色調に関する記述はKomerup & Wanscher
(1978)に従った。

(コロニーの巨視的特徴の観察)

・全縁が滑らかで僅かに、凸状の盛り上がりを示した。

10 気中菌糸 (aerial hypha) は綿毛状で、コロニー表面の色調は当初より、
White-reddish white (11A1-2)を示した。その後、8週間経過後も明らかな呈色
度合いの変化、及び分生子 (conidia) の着生による表面色調の変化は観察され
なかった。

15 ・コロニー裏面の色調は表面とほぼ同等で、PDA、MEA培地における長期間
の培養では、若干pale red (11A3)呈色が観察された。また、PDA、OAプレ
ートからは、僅かに透明な滲出液 (exudate) の産生が認められた。

(コロニーの微視的観察)

・小型分生子 (microconidia) と大型分生子 (macroconidia) の両方が観察さ
れた。

20 ・小型分生子は、フィロア型 (phialidic) でAcremonium属様の分生子柄
(conidiophore) の構造であった。分生子柄はほぼ単生で時折り2軸に分枝し、
気中菌糸の全般にかけて生じた。1～2細胞性で粘性を持っており、柄先端より
塊状となった。形状は楕円形 (ellipsoidal) から紡錘形 (fusiform) で、表面は
平滑 (smooth) からやや粗面 (slightly rough) であった。

25 ・大型分生子はFusarium属の大型分生子の形態で、3～6細胞性で三日月型
(luniform) で、表面は平滑、脚胞 (footcell) を有した。気中菌糸部に中厚か
らやや細く、短いものが多く観察された。また、細胞壁が脆弱で、大半の大型分
生子は表面が欠損していた。

Arx (1974)、Domish (1993)及び Malloch (1981)に記載されている分類体系

に基づいて、上記の結果を考察し、本菌体は*Fusarium*属に帰属すると推定された。同様の形態を示すものに*Cylindrocarpon*、*Candelabrella*、*Monacrosporium*、*Trichophoron*等が挙げられるが、本菌体は大型分生子が三日月型であること、気中菌糸が輪 (ring) を形成しないこと、また、小型分生子を形成すること、等からこれらとは区別され、“Gene of Hyphomycetes” (Carmichael et al., 1980)に記載の*Fusarium*属の定義に合致するものである。

この菌株は「*Fusarium* sp. GL 2-1 株」との表記の下、受託番号 FERM BP-8451 で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

10 種の同定 (リボソームの塩基配列の解析)

上記 GL 2-1 株の 18 S リボソーム DNA (18 S r DNA) 配列を調べることにより同定を試みた。

上記 (2) に記載の培養方法に従って GL 2-1 株を GV 培地で培養し、得られた菌糸体から常法により DNA を調製した。その後、この DNA を鋳型として、
15 PCR で r DNA の内部転写スペーサー (Internal transcribed spacer) 配列を増幅し、塩基配列を解析した (Mycopathologia Vol. 140 P35~49 1997 参照)。その結果、配列番号 1 に示す塩基配列が確認された。この塩基配列をホモロジー検索したところ、フサリウム プロリフェラタムと 100% のホモロジーがあることが判明した。

20 実施例 2 GL 2-1 株を用いる FAO の生産と同定

(1) FAO の部分精製

1) 培養と無細胞抽出液の調製

実施例 1 で同定した GL 2-1 株を、実施例 1 (2) に記載の GV 褐変培地 100 ml を用いて、同様の培地組成、培養条件下で培養した。

25 培養後、培養液をフィルターでろ過して菌糸体を回収し得られた菌糸体 0.6 g に 1 mM DTT を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて懸濁し、続いてミニビードビータ (ガラスビーズ 0.5 mm) により菌糸体を破碎後、遠心分離 (4℃、10,000×g、10 min) し、上清を無細胞抽出液とした。

2) 硫安分画

1) で得た無細胞抽出液を、硫酸アンモニウム濃度30～80%飽和画分を1 mMのDTTを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解し、同緩衝液で一晩透析した。

5 3) Resource Qカラムクロマトグラフィー

以下の条件で透析後の硫安画分のクロマトグラフィーを行った。

分析条件

カラム (容量) : Resource Qカラム (1 ml) (アマシャム バイオシステムズ社製)

10 流速 : 1 ml/min

緩衝液A : 50 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)+1 mM DTT

緩衝液B : 緩衝液A+1 M NaCl

溶出条件

0～5 min : 緩衝液B 0%

15 5～35 min : 緩衝液B 0～50%

35～40 min : 緩衝液B 50～100%

Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク (OD=280 nm) と活性の溶出パターンを図1に示す。FVを基質としたFAO活性で活性をモニターしたところ、2つの画分(Q1、Q2)に反応性が認められた。活性の測定は実施例1(3)に記載の方法に準じて行った。これらの画分に含有されるFAOを本明細書中、FAO-Q1、FAO-Q2と呼称する。

表 1 精製段階による活性の変化

工程	total unit(U)		比活性 (U/mg)	収率 (%)
無細胞抽出液	0.5		0.019	100
30～80%硫 安分画透析後	0.3		0.0199	60
Resource Q	Q1	0.22	0.3	44
	Q2	0.03	0.067	6

(2) FAO-Q1及びFAO-Q2の基質特異性の比較

上記の(1)、(3)で分離した2つの画分に含有される酵素(FAO-Q1、FAO-Q2)の基質特異性を調べた。酵素液として、上記2つの画分を用い、実施例1(3)に記載の方法に従って、FAO活性を測定した。基質として、FV、FVH、FVHL、FVL、FVLS、FZLを用いた。結果を表2に示す。

5 表 2 FAO-Q1、FAO-Q2の基質特異性

	相対活性 (%)	
	FAO-Q1	FAO-Q2
FV	100	100
FVH	n.d.	2.4
FVHL	n.d.	0.6
FVL	1.1	0.6
FVLS	n.d.	3.3
FZL	108	n.d.

FV:フルクトシルバリン、FVH:フルクトシルバリン-ヒスチジン、FVHL:フルクトシルバリン-ヒスチジン-ロイシン、FVL:フルクトシルバリン-ロイシン、FVLS:フルクトシルバリン-ロイシン-セリン、FZL:フルクトシルN- α Zリジン

10 n.d.: 検出せず

表2から、FAO-Q1はFV及びFZLの両方に同程度の活性を有し、かつFVLにも活性を示すこと、FAO-Q2はFVには活性があるがFZLには活性を示さず、FVH、FVHLというN-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示すことが明らかである。

15 (3) Km値の測定

FV又はFZLを基質として、実施例1(3)に記載の方法に従い、FAO-Q1及びFAO-Q2の存在下で測定し、FV又はFZLに対するKm値(ミカエリス定数)を求めた。結果を表3に示す。

表 3 FAO-Q1及びFAO-Q2のFV若しくはFZLに対するKm値

20

	FAO-Q1	FAO-Q2
FV	0.62	0.64
FZL	0.56	n. d.

n.d.: 検出せず

FVに対するKm値は、FAO-Q1、FAO-Q2でほぼ同程度であった。

一方、FAO-Q1のFZLに対する K_m 値はFVに対する K_m 値より小さく同酵素は、FVに比べてFZLに対する親和性が高いことが分った。

1) SDS電気泳動法による測定

常法に従ってSDS電気泳動法（ゲル濃度10～15w/v%のグラジエント
5 ゲル使用）により分子量の測定を行った。分子量既知の標準蛋白質としてアマシ
ヤム バイオシステムズ社製の分子量マーカー（ホスホリラーゼb：97kDa、
牛血清アルブミン：68kDa、オボアルブミン：45kDa、カルボニックア
ンヒドラーゼ：32kDa、トリプシンインヒビター：20.1kDa、 α -ラク
トアルブミン：14.4kDa）を使用して測定したところ、FAO-Q1の分
10 子量は約39kDaであり、FAO-Q2の分子量は約49kDaであった。

2) ゲル濾過法による測定

常法に従ってゲル濾過法による分子量の測定を行った。カラムサイズが1×
30cmのスーパーデックス200（アマシヤム バイオシステムズ社製）を用
い、分子量既知の標準蛋白質として、ロシュ・ダイアグノスティックス（株）社
15 製の分子量マーカー（アルドラーゼ 150kDa、牛血清アルブミン 68k
Da、オボアルブミン 45kDa、キモトリプシノーゲンA 25kDa、チト
クロームC 12.5kDa）を使用して検量線を作成し、本発明酵素の分子量
を算出した。結果を図2に示す。これより、FAO-Q1の分子量は約39.4
kDaであり、FAO-Q2の分子量は約58kDaであることが判明した。

20 (5) 部分アミノ酸の解析

N末端アミノ酸配列を決定するため、精製したFAO-Q2酵素を蒸留水に対
して透析した後、蛋白量として約40ngをN末端配列分析用の試料とした。N
末端配列はプロテインシーケンサー・モデル476A（アプライドバイオシステ
ムズ社製、米国）を用い、N末端から10残基まで分析した。N末端から得られ
25 たFAO-Q2の配列は、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列である
ことが判明した。一方FAO-Q1は、N末端がブロックされており、この方法
では決定できなかった。

実施例3 FAOcDNAのクローニング

GL2-1株のゲノムDNAを調製し、それを鋳型としてPCR法でFAOc

DNAを得た。

(1) GL 2-1株のゲノムDNAの調製

以下の工程に従い、GL 2-1株からゲノムDNAを得た。

- 5 1. 菌株を15 mlのD P培地 (1% デキストン (Dextone)、1% ペプトン (Peptone)、0.5% NaCl、pH 7.4) で30℃にて2-3日間液体培養する。
2. ガラスフィルター (3 GL) で集菌し、菌体 (湿重量0.3 g) を得る。
3. 得られた菌体を液体窒素が入った乳鉢と乳棒で破碎し、さらに乳鉢などで粉状にした後、コーニング管に集める。
- 10 4. 氷冷した2 ml TEバッファー (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA)を加え、軽くボルテックスする。
5. 2 mlの50 mM EDTA、0.5% SDS溶液を加え、数回転倒攪拌し、37℃で30分間インキュベートする。
6. 遠心分離 (3,000 rpm、10分間) する。
7. 上清をフェノールクロロホルムによる処理 (3回) に供する (但し、攪拌は転倒攪拌による。)
- 15 8. 2.5容のエタノールを加え、数回転倒攪拌する。この段階で糸状のDNAが確認できる。
9. 軽く遠心 (3,000 rpm、5分間) して沈降させるが、糸状にならない場合は通常のエタノール沈殿法に従い遠心する。
- 20 10. 沈殿を400 μ lのTEバッファー (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA) (以下同様) に溶かし、エッペンドルフチューブに移し、5 μ lのRNase (10 mg/ml) を加え、37℃、30分間インキュベートする。
11. フェノールクロロホルムによる処理を2回行った後、2.5容エタノールを加え、十分に転倒攪拌する。
- 25 12. 糸状のDNAをつまようじで新しいチューブに移す (余分なエタノールを除く)。
13. 50-100 μ lのTEに溶解する。 (緩やかにピペッティングし、ボルテックスはしない。)
14. DNAを定量する。1 μ gをアガロース電気泳動にかけてバンドを確認し

た。

(2) PCRによるcDNAの取得

1) 部分配列(約200bpフラグメント)の取得

既に明らかになっている糸状菌由来のFAODの全アミノ酸配列を用いて相
5 性が高い領域を検索し、その情報を基に以下のプライマーを設計した。

プライマー:

Forward primer(順方向): 5'-GGBTTYTTCWTSGARCCNRAYGA-3' (配
列番号7)

Reverse primer(逆方向): 5'-GTRCVGYRYMCCAGCAVAT-3' (配
10 列番号8)

上記ゲノムDNAを鋳型に用い、Taqポリメラーゼ(=TaKaRa Ex Taq(宝
酒造社製))を用いる標準的な反応液組成でPCRを行った。

PCR反応の条件:

プライマー(配列番号7)	: 0.2 μ M
15 プライマー(配列番号8)	: 0.2 μ M
10Ex Taq PCRバッファー(宝酒造社製)	: 10 μ l
塩化マグネシウム	: 2.5 mM
Taq ポリメラーゼ(宝酒造社製)	: 2.5 U

D.D.W.(二重脱イオン水)を加えて全量を100 μ lとする。

20 94℃、1分間を1サイクル; 94℃、1分間、50℃1分間、72℃、1分
間を35サイクル; 72℃、3分間を1サイクル。

PCR終了後、アガロースゲル電気泳動に反応液10 μ lを供したところ、200
bpに目的の断片と思われるバンドが確認された。そこでこのバンドを切り出し
て、インビトロジェン社製のTOPO TA Cloning Kitにて、該キットに添付の指
25 示書に従って処理し、E.coli JM109を形質転換した。この形質転換株を任意に
20株選択し、プラスミド抽出を行った。それぞれのプラスミドに対し制限酵素
処理を行い、適当なサイズのDNAが挿入されているプラスミドを選択し、配列
を決定した。配列決定は、BigDye Terminator Cycle Sequence Kitと、シ
ーケンサーとしてABI PRISM3100 Genetic Analyzerを用いて行った。

その結果、2つのアイソザイム（FAO-Q1とFAO-Q2）に相当するであろう2種類の塩基（ポリヌクレオチド）が得られた。決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に、精製酵素から決定したアミノ酸配列が確認された。このことより、上記PCRで増幅したDNA断片には、FAO-Q1をコードする遺伝子
5 遺伝子の一部、FAO-Q2をコードする遺伝子の一部が存在することがわかった。

2) 上流及び下流の部分配列、及び全長DNAの取得

上記1) で得た2種類の200bpフラグメントから上流及び下流に位置するDNA配列を、TaKaRaLA PCR in vitro Cloning Kitを使用し、解析した。得られたFAO-Q1とFAO-Q2の塩基配列をそれぞれ配列番号3及び配列番号
10 5に、これらによってコードされている推定のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号4及び6に示す。

産業上の利用分野

本発明によって新規なFAOが提供され、これらはアマドリ化合物の分析方法の発展に寄与することが期待される。特に、本発明のFAOのうち、糖化アミノ酸のみならず糖化ペプチドに対しても活性を有する酵素を用いることにより、糖化タンパクの分解が不完全な場合であっても糖化タンパクをより正確に測定することが可能となる。その結果、糖尿病における血糖値コントロールに重要なHb
15 A1cを正確に測定することができ、延いては糖尿病患者の治療や合併症の予防に貢献しうる。また、本発明の新規なフルクトシルアミノキシダーゼをコードするDNAは、遺伝子組換え技術を用いる酵素の効率的な大量生産を可能にし、
20 マドリ化合物の分析法の開発を促進すると期待される。

請 求 の 範 囲

1. フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) 由来のフルクトシルアミノキシダーゼ。
- 5 2. フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) 由来の酵素であって、次に示す理化学的特徴を有するフルクトシルアミノキシダーゼ。
 - ① フルクトシルバリンに対する活性が、フルクトシルリジンに対する活性とほぼ同等か若しくはそれよりも高い。
 - ② 酵素反応における至適 pH が 7.5 である。
 - 10 ③ 酵素の安定性に好適な温度が約 30～40℃である。
 - ④ SDS-PAGE による分子量が約 39 kDa であって、ゲル濾過法による分子量が約 39.4 kDa である。
3. 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する請求項 2 に記載のフルクトシルアミノキシダーゼ。
- 15 4. フサリウム プロリフェラタム由来の酵素であって、次に示す理化学的特徴を有するフルクトシルアミノキシダーゼ。
 - ① フルクトシルリジンに対して検出可能な活性がなく、フルクトシルバリンに対する活性がある。
 - ② 酵素反応における至適 pH が 7 である。
 - 20 ③ 酵素の安定性に好適な温度が約 30～40℃である。
 - ④ SDS-PAGE による分子量が約 49 kDa であって、ゲル濾過法による分子量が約 58 kDa である。
5. 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する請求項 3 に記載のフルクトシルアミノキシダーゼ。
- 25 6. 請求項 1～5 のいずれかに記載のフルクトシルアミノキシダーゼを生産することを特徴とする、フサリウム プロリフェラタム (FERM BP-8451)。
7. 請求項 1～5 のいずれかに記載のフルクトシルアミノキシダーゼをコードする DNA。
8. 配列番号 3 又は配列番号 5 に記載のヌクレオチド配列からなる請求項 7 記載

のDNA。

9. 請求項7又は8に記載のDNAで形質転換された宿主細胞。

10. 請求項6又は9に記載の微生物又は宿主細胞を培地に培養し、培養物からフルクトシルアミンオキシダーゼを回収することを特徴とする、フルクトシルアミンオキシダーゼの製造方法。

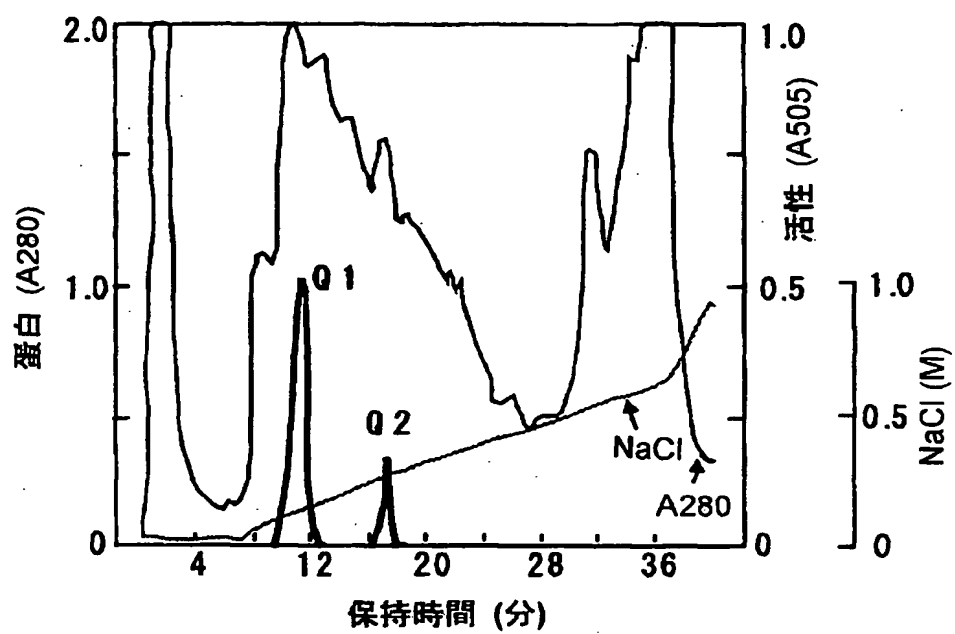
5

11. 請求項1～5のいずれかに記載のフルクトシルアミンオキシダーゼを用いることを特徴とする、試料中に含まれるアマドリ化合物を測定する方法。

10

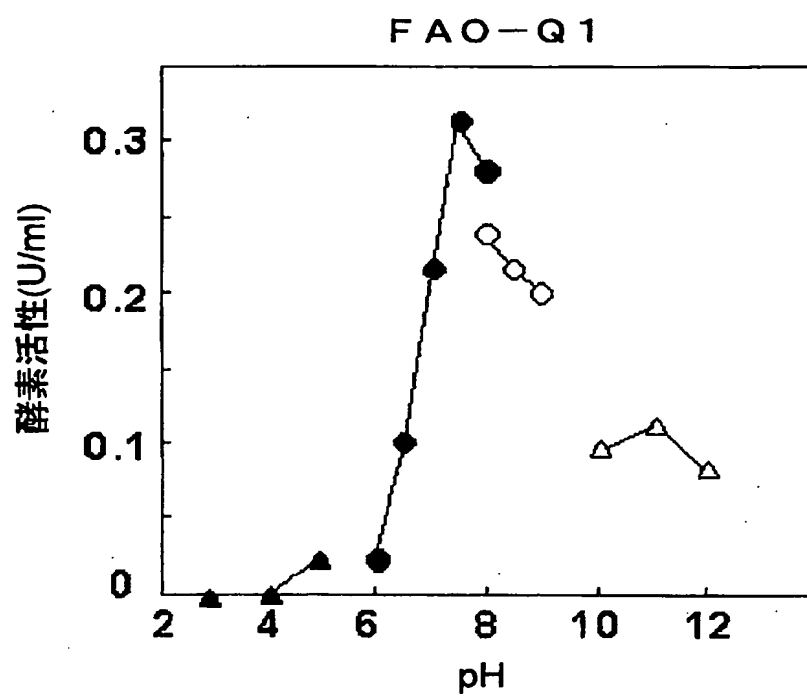
1 / 6

図 1



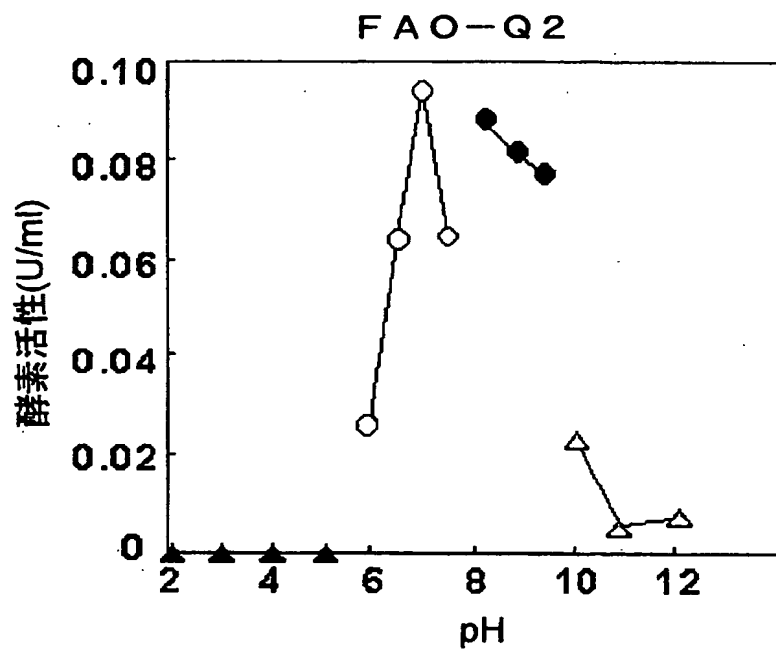
2 / 6

図 2



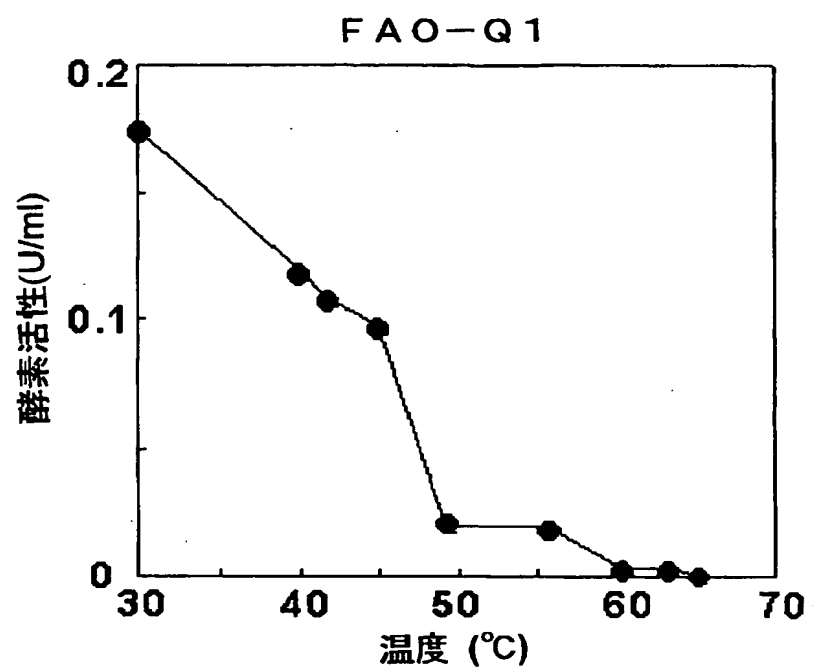
3 / 6

図 3



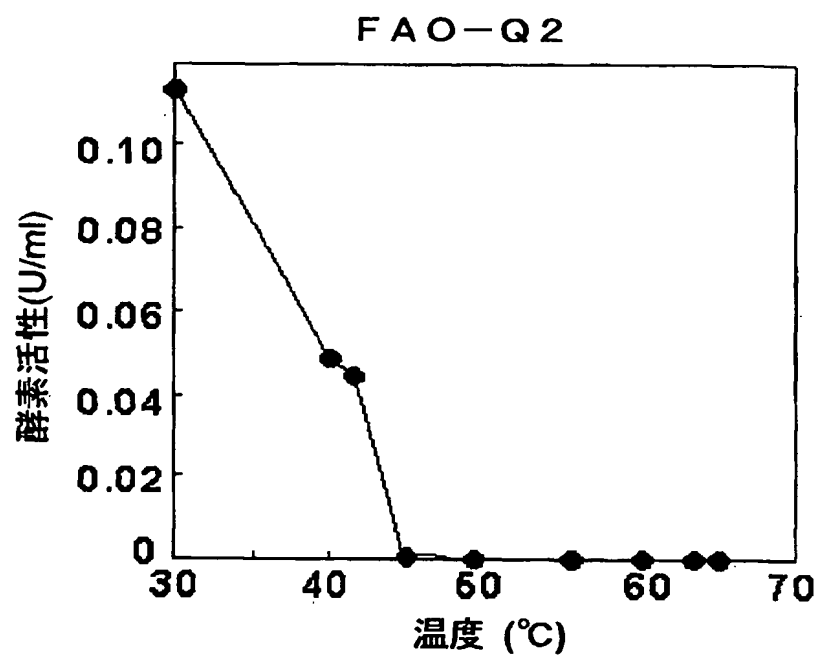
4 / 6

図 4



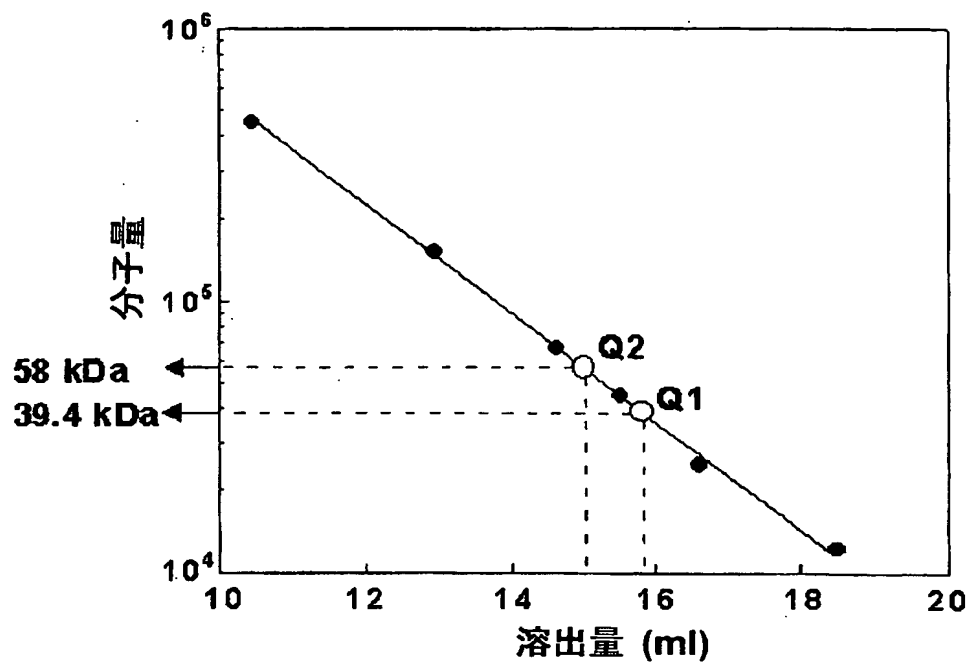
5 / 6

図 5



6 / 6

图 6



1/15

SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.

<120> Fructosylamine oxidase

<130> 663979

<150> JP 2002-277214

<151> 2002-09-24

<150> JP 2002-309734

<151> 2002-10-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 460

<212> DNA

<213> Fusarium proliferatum

<400> 1

aactcccaaa cccctgtgaa cataccaatt gttgcctcgg cggatcagcc cgctcccgt	60
aaaacgggac ggcccgccag aggacccta aactctgttt ctatatgtaa cttctgagta	120
aaaccataaa taaatcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga	180
acgcagcaaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg	240

2/15

aacgcacatt gcgcccgcga gtattctggc gggcatgcct gttcgagcgt catttcaacc 300
ctcaagcccc cgggttttgt gttggggatc ggcgagccct tgcggcaagc cggccccgaa 360
atctagtggc ggtctcgctg cagcttccat tgcgtagtag taaaaccctc gcaactggta 420
cgcggcgcgg ccaagccgtt aaacccccaa cttctgaatg 460

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Fusarium proliferatum*

<400> 2

Ala Arg Thr Val Ala Pro Leu Asn Lys Asp

1

5

10

<210> 3

<211> 1422

<212> DNA

<213> *Fusarium proliferatum*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1419)

<223>

<400> 3

atg gcc ggt cct ccc tct tcc atc ctt atc gtt ggc tct gga gtc ttc	48
Met Ala Gly Pro Pro Ser Ser Ile Leu Ile Val Gly Ser Gly Val Phe	
1 5 10 15	
ggg ctc ggt acc gcc tgg gct ttg gcc aaa cga tca cac ttt tcc aac	96
Gly Leu Gly Thr Ala Trp Ala Leu Ala Lys Arg Ser His Phe Ser Asn	
20 25 30	
acc tcg att act gtc gtc gac gac tgc gca gga cag ttt cct cca gaa	144
Thr Ser Ile Thr Val Val Asp Asp Cys Ala Gly Gln Phe Pro Pro Glu	
35 40 45	
gat gct gcc agt gta gac tcg tct cgc att gta cga gcc gac tac tcg	192
Asp Ala Ala Ser Val Asp Ser Ser Arg Ile Val Arg Ala Asp Tyr Ser	
50 55 60	
gac cct tac tat gcc gcg ctt gcc gcc gag gcg cag aag gaa tgg cga	240
Asp Pro Tyr Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Ala Gln Lys Glu Trp Arg	
65 70 75 80	
aag cag ggt gat cat gag gtc ggt ggg cag gga cga tat tcc gag tcg	288
Lys Gln Gly Asp His Glu Val Gly Gly Gln Gly Arg Tyr Ser Glu Ser	
85 90 95	
ggc ttt gtt ctc tgc gcg agc gag act cct gaa gac ttc aag ctc aag	336
Gly Phe Val Leu Cys Ala Ser Glu Thr Pro Glu Asp Phe Lys Leu Lys	
100 105 110	
aag tct ggc atg gac tac acc aag gag agc gcc aaa aac gtc gag ttg	384
Lys Ser Gly Met Asp Tyr Thr Lys Glu Ser Ala Lys Asn Val Glu Leu	
115 120 125	
att gct aag gag act ggt ctg ccc gtg gat aag atc cag aag ctg gag	432
Ile Ala Lys Glu Thr Gly Leu Pro Val Asp Lys Ile Gln Lys Leu Glu	
130 135 140	
agt acc aag gct ctc caa gag ttc ctt ggc aca gac ggt tat ccc gga	480
Ser Thr Lys Ala Leu Gln Glu Phe Leu Gly Thr Asp Gly Tyr Pro Gly	
145 150 155 160	

4/15

gac tgg ggc tac ctc aat ggc aac tct ggc tgg gct gat gcc ggg gag	528
Asp Trp Gly Tyr Leu Asn Gly Asn Ser Gly Trp Ala Asp Ala Gly Glu	
165 170 175	
ggt atg aag tgg ctc tat aag cag gcc cag gcc aca gga cgt att cat	576
Gly Met Lys Trp Leu Tyr Lys Gln Ala Gln Ala Thr Gly Arg Ile His	
180 185 190	
ttt gtc aac ggc aag gtg aca gag ctc gta aca gag ggt gac cga gtc	624
Phe Val Asn Gly Lys Val Thr Glu Leu Val Thr Glu Gly Asp Arg Val	
195 200 205	
att ggt gcg aaa ttg agc gat tca aag att ctc aag gcc gat gtg gtt	672
Ile Gly Ala Lys Leu Ser Asp Ser Lys Ile Leu Lys Ala Asp Val Val	
210 215 220	
atg gta gct gct ggt gct tgg tcc ggc tca ctc gtt gac ctt cga gga	720
Met Val Ala Ala Gly Ala Trp Ser Gly Ser Leu Val Asp Leu Arg Gly	
225 230 235 240	
aga aca gag gct act ggc cat gct gtc gcg tat atg gac atc aca ccg	768
Arg Thr Glu Ala Thr Gly His Ala Val Ala Tyr Met Asp Ile Thr Pro	
245 250 255	
gaa gag cag aag cga ctc gac aac ttc cct gtg gtg ttg aat ctc agc	816
Glu Glu Gln Lys Arg Leu Asp Asn Phe Pro Val Val Leu Asn Leu Ser	
260 265 270	
acc ggt ctc ttc ctc att cct cct cga aat aac gtc ctc aag gcc gcc	864
Thr Gly Leu Phe Leu Ile Pro Pro Arg Asn Asn Val Leu Lys Ala Ala	
275 280 285	
cga cac aca ttc ggg tac att aac ccg gtc aag att aac aac gct ctt	912
Arg His Thr Phe Gly Tyr Ile Asn Pro Val Lys Ile Asn Asn Ala Leu	
290 295 300	
cct cct tcg ccc aac gat aag cgg gaa cca ttc atc gca tct caa ccc	960
Pro Pro Ser Pro Asn Asp Lys Arg Glu Pro Phe Ile Ala Ser Gln Pro	
305 310 315 320	

5/15

tac acc tct cgc aac gat tcc tca aat cct tta acc gtc gag gct gac Tyr Thr Ser Arg Asn Asp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Val Glu Ala Asp 325 330 335	1008
aaa gat ctg cgc cgc gca ctc acg gat ctg tgt cct ata cgt ggc cta Lys Asp Leu Arg Arg Ala Leu Thr Asp Leu Cys Pro Ile Arg Gly Leu 340 345 350	1056
gaa acc agg cca tgg aag gag gct cga atc tgc tgg tat tcc gat aca Glu Thr Arg Pro Trp Lys Glu Ala Arg Ile Cys Trp Tyr Ser Asp Thr 355 360 365	1104
cga gat ggc gag tgg ctc att gac tac cac ccg ggc tgg aag gga ctc Arg Asp Gly Glu Trp Leu Ile Asp Tyr His Pro Gly Trp Lys Gly Leu 370 375 380	1152
ttt gtt gca aca ggt gac agt gga cac gga ttc aag ttc cta ccc aac Phe Val Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Gly Phe Lys Phe Leu Pro Asn 385 390 395 400	1200
ttg ggt gag aaa atc gtg gat gtt atg caa ggc cag ggt ggc aag ctt Leu Gly Glu Lys Ile Val Asp Val Met Gln Gly Gln Gly Gly Lys Leu 405 410 415	1248
ggc gag aag tgg cga tgg aaa gag atc cag aat gat gga gtc gga aga Gly Glu Lys Trp Arg Trp Lys Glu Ile Gln Asn Asp Gly Val Gly Arg 420 425 430	1296
gag acg aac gga gtg tac act ggt tta gtg acg gaa gat ggt agc aga Glu Thr Asn Gly Val Tyr Thr Gly Leu Val Thr Glu Asp Gly Ser Arg 435 440 445	1344
ggt gga cgg ccc ttg gtg ctc tgt gat gag ctc gag aag ggc agg gcg Gly Gly Arg Pro Leu Val Leu Cys Asp Glu Leu Glu Lys Gly Arg Ala 450 455 460	1392
ctt att ggg aac acc aag gcc aag cta tga Leu Ile Gly Asn Thr Lys Ala Lys Leu 465 470	1422

6/15

<210> 4

<211> 473

<212> PRT

<213> *Fusarium proliferatum*

<400> 4

Met Ala Gly Pro Pro Ser Ser Ile Leu Ile Val Gly Ser Gly Val Phe
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Ala Trp Ala Leu Ala Lys Arg Ser His Phe Ser Asn
20 25 30

Thr Ser Ile Thr Val Val Asp Asp Cys Ala Gly Gln Phe Pro Pro Glu
35 40 45

Asp Ala Ala Ser Val Asp Ser Ser Arg Ile Val Arg Ala Asp Tyr Ser
50 55 60

Asp Pro Tyr Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Ala Gln Lys Glu Trp Arg
65 70 75 80

Lys Gln Gly Asp His Glu Val Gly Gly Gln Gly Arg Tyr Ser Glu Ser
85 90 95

Gly Phe Val Leu Cys Ala Ser Glu Thr Pro Glu Asp Phe Lys Leu Lys
100 105 110

Lys Ser Gly Met Asp Tyr Thr Lys Glu Ser Ala Lys Asn Val Glu Leu
115 120 125

Ile Ala Lys Glu Thr Gly Leu Pro Val Asp Lys Ile Gln Lys Leu Glu
130 135 140

7/15

Ser Thr Lys Ala Leu Gln Glu Phe Leu Gly Thr Asp Gly Tyr Pro Gly
145 150 155 160

Asp Trp Gly Tyr Leu Asn Gly Asn Ser Gly Trp Ala Asp Ala Gly Glu
165 170 175

Gly Met Lys Trp Leu Tyr Lys Gln Ala Gln Ala Thr Gly Arg Ile His
180 185 190

Phe Val Asn Gly Lys Val Thr Glu Leu Val Thr Glu Gly Asp Arg Val
195 200 205

Ile Gly Ala Lys Leu Ser Asp Ser Lys Ile Leu Lys Ala Asp Val Val
210 215 220

Met Val Ala Ala Gly Ala Trp Ser Gly Ser Leu Val Asp Leu Arg Gly
225 230 235 240

Arg Thr Glu Ala Thr Gly His Ala Val Ala Tyr Met Asp Ile Thr Pro
245 250 255

Glu Glu Gln Lys Arg Leu Asp Asn Phe Pro Val Val Leu Asn Leu Ser
260 265 270

Thr Gly Leu Phe Leu Ile Pro Pro Arg Asn Asn Val Leu Lys Ala Ala
275 280 285

Arg His Thr Phe Gly Tyr Ile Asn Pro Val Lys Ile Asn Asn Ala Leu
290 295 300

Pro Pro Ser Pro Asn Asp Lys Arg Glu Pro Phe Ile Ala Ser Gln Pro
305 310 315 320

Tyr Thr Ser Arg Asn Asp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Val Glu Ala Asp
325 330 335

Lys Asp Leu Arg Arg Ala Leu Thr Asp Leu Cys Pro Ile Arg Gly Leu
340 345 350

8/15

Glu Thr Arg Pro Trp Lys Glu Ala Arg Ile Cys Trp Tyr Ser Asp Thr
 355 360 365

Arg Asp Gly Glu Trp Leu Ile Asp Tyr His Pro Gly Trp Lys Gly Leu
 370 375 380

Phe Val Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Gly Phe Lys Phe Leu Pro Asn
 385 390 395 400

Leu Gly Glu Lys Ile Val Asp Val Met Gln Gly Gln Gly Gly Lys Leu
 405 410 415

Gly Glu Lys Trp Arg Trp Lys Glu Ile Gln Asn Asp Gly Val Gly Arg
 420 425 430

Glu Thr Asn Gly Val Tyr Thr Gly Leu Val Thr Glu Asp Gly Ser Arg
 435 440 445

Gly Gly Arg Pro Leu Val Leu Cys Asp Glu Leu Glu Lys Gly Arg Ala
 450 455 460

Leu Ile Gly Asn Thr Lys Ala Lys Leu
 465 470

<210> 5

<211> 1335

<212> DNA

<213> *Fusarium proliferatum*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1332)

9/15

<223>

<400> 5

atg gcc cgt act gtt gcc ccg ctc aat aag gac tca ggg att ctc atc 48
 Met Ala Arg Thr Val Ala Pro Leu Asn Lys Asp Ser Gly Ile Leu Ile
 1 5 10 15

gtt ggt ggc gga act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt 96
 Val Gly Gly Gly Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg
 20 25 30

cgg ggt tac acc aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca 144
 Arg Gly Tyr Thr Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser
 35 40 45

ccg ata tca gcc ggg cat gat gta aac aaa ctt tct aac aga cta ggc 192
 Pro Ile Ser Ala Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ser Asn Arg Leu Gly
 50 55 60

act tct gat agt aaa ggc gat gac gaa gac tca atc tgg aaa gct ctt 240
 Thr Ser Asp Ser Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu
 65 70 75 80

acg tac gcc gca gct caa gga tgg ctc cat gat ccc atc ttc caa cct 288
 Thr Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Ile Phe Gln Pro
 85 90 95

ttc tgc cac aat aca gga gct gtc atg gct ggc tca aca cca aaa tct 336
 Phe Cys His Asn Thr Gly Ala Val Met Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser
 100 105 110

atc aag cag ctg gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat 384
 Ile Lys Gln Leu Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr
 115 120 125

aca cct ctc aac aca gca gaa gat ttc aga agg act atg ccg gag cgt 432
 Thr Pro Leu Asn Thr Ala Glu Asp Phe Arg Arg Thr Met Pro Glu Arg
 130 135 140

att ctg aca ggt gat ttt cta ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc aga	480
Ile Leu Thr Gly Asp Phe Leu Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Arg	
145 150 155 160	
ggt tca ggt tgg gtt cat gcc aga aag gct atg aaa gct gct ttt gaa	528
Gly Ser Gly Trp Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu	
165 170 175	
gag agc cag aga ctt ggt gtc aag ttc atc act ggc tct ccc gaa ggc	576
Glu Ser Gln Arg Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly	
180 185 190	
aag gtc gag agt ctg gtc ttt gaa gct ggt gat gtc aaa ggt gca aaa	624
Lys Val Glu Ser Leu Val Phe Glu Ala Gly Asp Val Lys Gly Ala Lys	
195 200 205	
aca gca gat gga aag gaa cac aga gcg gat cga aca att ctc tcc gct	672
Thr Ala Asp Gly Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala	
210 215 220	
ggt gcc tca gca gag ttc tcc ctc gat ttt gag aac cag atc cgt cct	720
Gly Ala Ser Ala Glu Phe Ser Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Arg Pro	
225 230 235 240	
acg gca tgg act ctg ggc cat atc cag atg aca gca gag gaa aca aag	768
Thr Ala Trp Thr Leu Gly His Ile Gln Met Thr Ala Glu Glu Thr Lys	
245 250 255	
ctg tac aag gaa ctt ccc ccc ctt ttc aat atc aac cag ggc ttc ttc	816
Leu Tyr Lys Glu Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe	
260 265 270	
atg gaa ccc gat gag gac ttg cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat	864
Met Glu Pro Asp Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His	
275 280 285	
ccc gga tac tgc aat tgg gtt gac aaa cct ggt tcc aaa tac ccc cag	912
Pro Gly Tyr Cys Asn Trp Val Asp Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln	
290 295 300	

11/15

tcc atc ccc ttc gca aag tat caa gtg cca att gag gct gaa cga cgc	960
Ser Ile Pro Phe Ala Lys Tyr Gln Val Pro Ile Glu Ala Glu Arg Arg	
305 310 315 320	
atg aag caa ttt ctg aaa gac atc atg cct cag ctc gca gat cgg cca	1008
Met Lys Gln Phe Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro	
325 330 335	
ctt gtt cat gct cga atc tgc tgg tgc gcc gat aca cag gat aga atg	1056
Leu Val His Ala Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met	
340 345 350	
ttt ctg atc acg tat cac cct cga cac cca tgc ctt gtc att gct tcc	1104
Phe Leu Ile Thr Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser	
355 360 365	
ggg gat tgt ggc aca gga tac aag cat atc act tcc att gga aag ttc	1152
Gly Asp Cys Gly Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe	
370 375 380	
atc tct gat tgt atg gag ggc aca ttg gag gaa agg ttt gct aag ttc	1200
Ile Ser Asp Cys Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Phe	
385 390 395 400	
tgg aga tgg cga cca gag aag ttt acg gag ttc tgg ggt aaa gat ccc	1248
Trp Arg Trp Arg Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro	
405 410 415	
ctg gat cgg ttt gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt	1296
Leu Asp Arg Phe Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser	
420 425 430	
gat gca gag gga tgg aca gac ata cag aat gat aaa taa	1335
Asp Ala Glu Gly Trp Thr Asp Ile Gln Asn Asp Lys	
435 440	

12/15

<212> PRT

<213> *Fusarium proliferatum*

<400> 6

Met Ala Arg Thr Val Ala Pro Leu Asn Lys Asp Ser Gly Ile Leu Ile
1 5 10 15

Val Gly Gly Gly Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg
20 25 30

Arg Gly Tyr Thr Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser
35 40 45

Pro Ile Ser Ala Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ser Asn Arg Leu Gly
50 55 60

Thr Ser Asp Ser Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu
65 70 75 80

Thr Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Ile Phe Gln Pro
85 90 95

Phe Cys His Asn Thr Gly Ala Val Met Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser
100 105 110

Ile Lys Gln Leu Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr
115 120 125

Thr Pro Leu Asn Thr Ala Glu Asp Phe Arg Arg Thr Met Pro Glu Arg
130 135 140

Ile Leu Thr Gly Asp Phe Leu Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Arg
145 150 155 160

Gly Ser Gly Trp Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu
165 170 175

13/15

Glu Ser Gln Arg Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly
 180 185 190

Lys Val Glu Ser Leu Val Phe Glu Ala Gly Asp Val Lys Gly Ala Lys
 195 200 205

Thr Ala Asp Gly Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala
 210 215 220

Gly Ala Ser Ala Glu Phe Ser Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Arg Pro
 225 230 235 240

Thr Ala Trp Thr Leu Gly His Ile Gln Met Thr Ala Glu Glu Thr Lys
 245 250 255

Leu Tyr Lys Glu Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe
 260 265 270

Met Glu Pro Asp Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His
 275 280 285

Pro Gly Tyr Cys Asn Trp Val Asp Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln
 290 295 300

Ser Ile Pro Phe Ala Lys Tyr Gln Val Pro Ile Glu Ala Glu Arg Arg
 305 310 315 320

Met Lys Gln Phe Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro
 325 330 335

Leu Val His Ala Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met
 340 345 350

Phe Leu Ile Thr Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser
 355 360 365

Gly Asp Cys Gly Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe
 370 375 380

14/15

Ile Ser Asp Cys Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Phe
385 390 395 400

Trp Arg Trp Arg Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro
405 410 415

Leu Asp Arg Phe Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser
420 425 430

Asp Ala Glu Gly Trp Thr Asp Ile Gln Asn Asp Lys
435 440

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A peptide designed on the basis of the peptide produced by *Fusarium proliferatum*

<400> 7

Gly Gly Asx Thr Thr Tyr Thr Thr Cys Trp Thr Ser Gly Ala Arg Cys
1 5 10 15

Cys Asn Arg Ala Tyr Gly Ala
20

<210> 8

<211> 19

15/15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A peptide designed on the basis of the peptide produced by *Fusarium proliferatum*

<400> 8

Gly	Thr	Arg	Cys	Val	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Met	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala
1				5					10					15	

Val Ala Thr

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/53, C12N9/06, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/26 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/53, C12N9/06, C12Q1/26 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS), SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 10-201473 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 04 August, 1998 (04.08.98), (Family: none)	<u>1, 7, 9, 10, 11</u> 2-6, 8
<u>X</u> A	US 5712138 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 27 January, 1998 (27.01.98), & EP 709457 A1 & JP 8-154672 A	<u>1, 11</u> 2-10
<u>X</u> A	YOSHIDA, N. et al., Distribution and properties of fructosyl amino acid oxidase in fungi., Appl. Environ. Microbiol., 1995, Vol.61, No.12, pages 4487 to 4489	<u>1, 11</u> 2-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 November, 2003 (27.11.03)		Date of mailing of the international search report 09 December, 2003 (09.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REGAKADO V. et al., Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus fungus fusarium proliferatum., Applied Microbiology and Biotechnmology, 1999, Vol.51, No.3, pages 388 to 390	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/53, C12N9/06, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/53, C12N9/06, C12Q1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS ファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 10-201473 A (旭化成工業株式会社) 1998. 08. 04 (ファミリーなし)	<u>1, 7, 9, 10, 11</u> 2-6, 8
<u>X</u> A	US 5712138 A (株式会社京都第一科学) 1998. 01. 27 & EP 709457 A1 & JP 8-154672 A	<u>1, 11</u> 2-10
<u>X</u> A	YOSHIDA N. et al., Distribution and properties of fructosyl amino acid oxidase in fungi., Appl. Environ. Microbiol. 1995, Vol. 61, No. 12, p. 4487-4489	<u>1, 11</u> 2-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	REGALADO V. et al., Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus fusarium proliferatum., Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, Vol.51, No.3, p.388-390	1-11